

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ NOUVEAUX LIPOSOMES DE VACCINATION GENIQUE.

②② Date de dépôt : 10.09.10.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 16.03.12 Bulletin 12/11.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 19.10.12 Bulletin 12/42.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE DE COOPERATION
INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT
(CIRAD) — FR et INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACION Y TECNOLOGIA AGRARIA Y
ALIMENTARIA (INIA) — ES.

⑦② Inventeur(s) : MOCKEY MICHAEL, DEDIEU
LAURENCE, TAFALLA CAROLINA et CUESTA
ALBERTO.

⑦③ Titulaire(s) : CENTRE DE COOPERATION
INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT
(CIRAD), INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACION Y TECNOLOGIA AGRARIA Y
ALIMENTARIA (INIA).

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

FR 2 964 569 - B1



NOUVEAUX LIPOSOMES DE VACCINATION GENIQUE

La présente invention se rapporte à de nouveaux liposomes utiles pour transférer des cellules *in vitro* et *in vivo*, et en particulier comme supports de vaccination génique ; ces liposomes, associés à du matériel génétique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène, et encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène, tel qu'un gel d'alginate, sont particulièrement adaptés à la vaccination par la voie orale d'animaux d'élevage, en particulier, d'animaux aquatiques.

La vaccination génique (ou génétique) est une vaccination à base d'ADN ou d'ARN "nu" ; elle consiste à administrer à un organisme animal ou humain une partie du matériel génétique de l'agent pathogène contre lequel on recherche l'immunisation.

Plus précisément, le matériel génétique correspond à un vecteur d'expression comprenant un fragment d'ADN (ou à la séquence ARN correspondante) codant pour une protéine antigénique capable de déclencher une réaction immunitaire protectrice. L'ADN du pathogène s'exprime alors dans le noyau des cellules de l'hôte à vacciner ; lorsqu'il s'agit d'ARN, il s'exprime dans le cytoplasme desdites cellules ; il y a production d'antigène ; celui-ci est présenté au système immunitaire et déclenche une réponse.

Lorsque l'agent pathogène est un virus, l'antigène viral provoque une double réponse immunitaire : humorale (production d'anticorps capables, lors d'une infection, de reconnaître spécifiquement cet antigène sur le virus) et cellulaire (incluant l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dont le rôle est de détruire les cellules infectées par le virus).

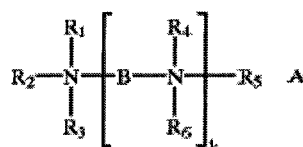
Cette technique présente l'avantage de permettre de vacciner contre toutes les maladies infectieuses.

Chez l'animal, les vaccins à ADN ont donné des résultats probants pour un grand nombre de maladies, notamment la grippe chez les primates, le paludisme, le VIH chez la souris.

Les Brevets Américains US 5,780,448 et US 6,180,614 décrivent des vaccins géniques adaptés pour la vaccination de poissons constitués d'oligonucléotides d'ADN codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène (virus, bactérie ou parasite) et de liposomes ; ces liposomes sont, par exemple, constitués de lipides neutres tels que du DOPE (L- α -dioleoyl phosphatidyléthanolamine, 1,2-

dioléoyloxyphosphatidyléthanolamine ou 1,2-dioleoylphosphatidyléthanolamine) ou du cholestérol et d'un lipide cationique.

Le Brevet Américain US 6,733,777 propose des liposomes cationiques adaptés à la délivrance de composés dans des cellules *in vitro* ou *in vivo*. Ces liposomes comprennent un lipide neutre tel que du DOPE, du cholestérol ou de la dioléoylphosphatidylcholine (DPOC) et une ou plusieurs cytofectines cationiques de formule (I) :



Ces liposomes sont notamment adaptés comme support d'ADN pour transférer des cellules *in vivo*.

Romoren *et al.* ont cependant décrit que certains de ces liposomes, en particulier, les liposomes composés de DOPE et de DOTAP à un ratio massique 1:1, utilisées pour la vaccination génique de poissons pouvaient présenter un effet toxique sur les poissons en les asphyxiant par fixation aux branchies (J. Controlled Release (2002) 85:203-213).

Il demeure donc le besoin de préparer des supports de vaccination génique conduisant à une réaction immunitaire efficace tout en préservant une bonne innocuité de la formulation.

C'est ce à quoi est parvenue la Demanderesse en mettant au point de nouveaux liposomes composés :

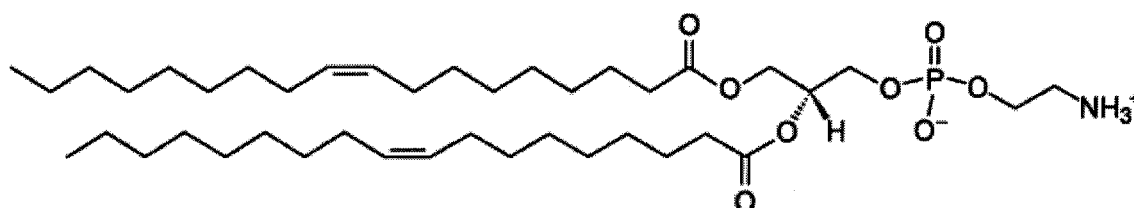
- de DOPE et/ou d'un variant du DOPE porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques,
- de DOTAP et/ou d'un variant du DOTAP porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques et
- de cardiolipine et/ou d'un variant de la cardiolipine porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques.

Par ligand pour le ciblage de cellules dendritiques, on entend des composés qui se fixent sur les récepteurs de cellules dendritiques tels que, par exemple, la biotine, des oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément (notamment C3, C5...), des immunoglobulines ou leur fraction cristallisable (Fc)...

Selon une variante préférée, les liposomes selon l'invention sont composés du DOPE et/ou d'un variant du DOPE porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques, de DOTAP et/ou d'un variant du DOTAP porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques et de cardiolipine et/ou d'un variant de la cardiolipine porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques à l'exclusion de tout autre composé.

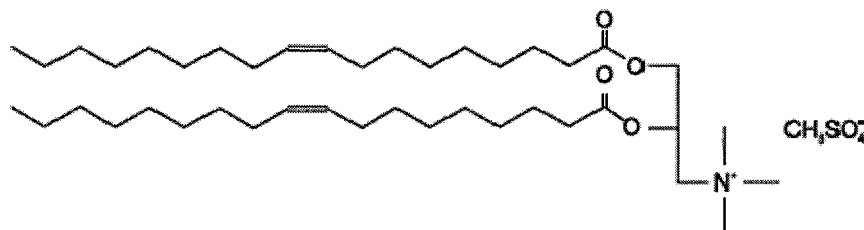
Ces nouveaux liposomes sont particulièrement utiles comme support de matériel génétique.

Le DOPE est un lipide neutre de structure chimique :



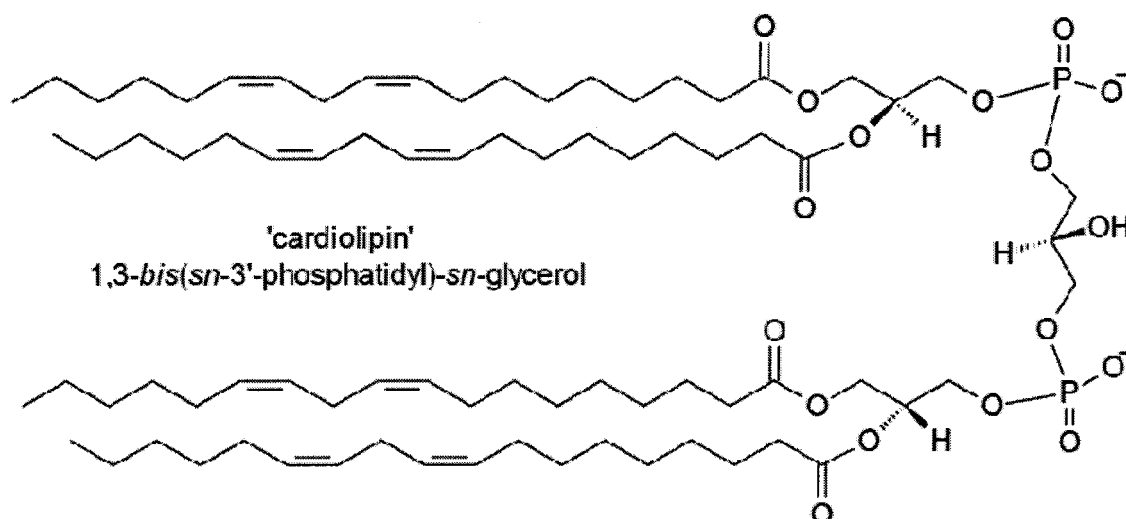
La teneur en DOPE ou en variant du DOPE dans les liposomes selon l'invention est comprise entre 10 et 50% en poids par rapport au poids total de liposomes.

Le DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium méthylsulfate) est un lipide cationique de structure chimique :



La teneur en DOTAP ou en variant du DOTAP dans les liposomes selon l'invention est comprise entre 10 et 50% en poids par rapport au poids total de liposomes.

La cardiolipine (glycérol bisphosphatidyle) est un lipide anionique qui représente 18% des molécules de la membrane interne de la mitochondrie et qui est responsable de la forte imperméabilité de la membrane interne aux protons.



La teneur en cardiolipine ou en variant de la cardiolipine dans les liposomes selon l'invention est comprise entre 5 et 30% en poids par rapport au poids total de liposomes.

- 5 Selon une variante préférée de l'invention, les trois lipides sont présents dans un ratio DOPE et/ou de son variant : DOTAP et/ou de son variant : cardiolipine et/ou de son variant de 1:1:0,5 en poids.

Les liposomes selon l'invention sont préparés selon les techniques connues de l'homme du métier.

- 10 Une telle technique peut par exemple comprendre les étapes suivantes :

- mise en suspension de chacun des lipides dans un solvant polaire tel que l'éthanol à raison de 20 mg de lipides/ml ;

- mélange des lipides neutre et cationique (DOPE et DOTAP) en solution ;

- 15 - formation d'un film lipidique par évaporation du ou des solvants par séchage sous vide d'air (avec, par exemple, un évaporateur Speedvac®) et/ou par chauffage sous rotation (en utilisant, par exemple, comme matériel le rotavap) à 55-60°C sur la nuit ;

- dilution du film lipidique par ajout du lipide anionique (cardiolipine)

- 20 solubilisé dans l'éthanol ;

- formation des liposomes par ajout d'eau ;

- optionnellement, l'extrusion de la suspension est réalisée sur membrane-filtre de polycarbonate (présentant par exemple des pores de 100 nm de

diamètre) à l'aide d'un extrudeur discontinu (par exemple : « LiposoFast » d'Avanti Polar) ou continu haute-pression (par exemple : « Maximator HPE 12.0-100 », de Dispex) ;

- dilution des liposomes dans une solution à pH acide (par exemple à pH~5) lors de l'étape de formation des complexes ; il est possible d'utiliser d'autres solutions aqueuses isotoniques tampons comme le tampon MES (acide 2-morpholino éthanesulfonique monohydraté), le tampon MOPS (acide N-morpholino-3-propane sulfonique), le tampon Tris (trishydroxyméthylaminométhane), etc... lors de cette étape.

Ces liposomes sont utiles comme support de matériel génétique pour la transfection de cellules *in vitro* ou *in vivo*.

Par support de matériel génétique, il est entendu que les liposomes selon l'invention sont avantageusement associés à du matériel génétique et permettent l'administration dudit matériel à des cellules *in vitro* ou *in vivo*.

Par matériel génétique, on entend des acides nucléiques, synthétiques ou naturels, simple ou double brins, tels que l'ADN génomique, l'ADNc, des plasmides, des oligonucléotides, l'ARN, notamment l'ARNm sens ou antisens ou des ARN interférents.

Ces liposomes sont particulièrement efficaces pour délivrer du matériel génétique dans les cellules ; c'est-à-dire transfecter des cellules *in vitro* ou *in vivo*, ce qui consiste à introduire ledit matériel génétique dans le cytoplasme et/ou le noyau et/ou les organelles cellulaires des cellules ; ils trouvent une application particulière comme support de vaccination génique.

Ainsi les liposomes selon l'invention sont avantageusement utilisés comme support de matériel génétique pour vaccination génique, car l'effet cytotoxique est limité.

Lorsqu'ils sont utilisés à des fins vaccinales, les liposomes selon l'invention sont associés à du matériel génétique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène contre lequel on veut vacciner un individu. L'expression par les cellules de l'individu de ce polypeptide antigénique provoque une réaction immunitaire qui permettra la reconnaissance dudit agent pathogène par le système immunitaire dudit individu en cas d'infection ultérieure par ledit agent pathogène.

Selon un autre de ses objets, la présente invention se rapporte à des lipoplexes comprenant un liposome selon l'invention et du matériel génétique permettant l'expression d'un polypeptide antigénique d'un agent pathogène et conduisant à une vaccination par l'induction d'une réponse immunitaire contre ledit agent pathogène.

Les agents pathogènes sont notamment des virus, des bactéries, des levures, des champignons ou des parasites.

Le matériel génétique codant pour le polypeptide antigénique se présente sous la forme d'un vecteur d'expression comprenant une séquence de contrôle de l'expression adaptée à l'individu à vacciner, et au moins un fragment nucléotidique codant pour ledit polypeptide antigénique.

En particulier, le vecteur d'expression est un plasmide dans lequel est introduit une séquence codante tel que le plasmide pMCV1.4 (Ready Vector, Madrid, Espagne; *Cuesta and Tafalla, Vaccine, 2009, 27 :280-289.*) représenté à la Figure 1 et de séquence nucléotidique SEQ. ID. N°1 ou le plasmide pcDNA3.1 d'Invitrogen représenté à la Figure 2 et de séquence nucléotidique SEQ. ID. N°2.

Le fragment nucléotidique codant pour le polypeptide antigénique est choisi selon l'agent pathogène contre lequel on veut obtenir une immunisation.

La préparation du vecteur d'expression est réalisée selon les méthodes classiques de l'homme du métier ; à titre d'exemple et quel que soit le fragment nucléotidique à cloner dans le vecteur d'expression, ce dernier peut être préparé en utilisant la méthode décrite dans *Cuesta and Tafalla, Vaccine, 2009, 27: 280-289* qui s'applique à l'introduction du gène G du virus de la septicémie hémorragique virale (VHSH) ou la méthode décrite dans *Cuesta et al., Vaccine, 28 (2010) 3291-3300* qui s'applique à l'introduction du gène VP1 du virus de nécrose hématopoïétique infectieuse (IPNV).

L'utilisation des lipoplexes selon l'invention s'avère particulièrement utile et efficace pour la vaccination à grande échelle d'animaux d'élevage ; en effet, cette forme de vaccin peut notamment être administrée par la voie orale, évitant ainsi l'injection qui demande une manipulation des animaux par un spécialiste et qui est traumatisante pour les animaux.

On entend par animaux d'élevage, les animaux de pacage tels que les bovins, les ovins, les caprins, les porcins, les équidés, les camélidés et les cervidés ; les animaux de basse-cour, tels que les lapins et les oiseaux ; les animaux aquatiques, l'aquaculture comprenant la pisciculture, la conchyliculture et l'élevage de crustacés et enfin, les animaux de compagnie.

Selon un mode réalisation particulier de l'invention, les lipoplexes sont encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène tel qu'un gel d'alginate ; ils présentent alors un intérêt particulier pour la vaccination orale d'animaux aquatiques car

ledit gel évite la dilution du principe actif dans l'eau. Les animaux aquatiques sont en particulier des poissons marins tels que bar, dorade, saumon, thon, turbot etc., des poissons d'étang tels que carpe, brochet, gardon, esturgeon etc, et des poissons d'eau douce tels que silure, truite etc.

5 Les peptides antigéniques d'agents pathogènes utilisables pour la vaccination d'animaux aquatiques sont :

- lorsque les agents pathogènes sont des virus, par exemple : les glycoprotéines (G) du virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV) ; du virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV) ; les protéines structurales VP1 ou VP2 du virus de la nécrose pancréatique infectieuse (IPNV) ; la protéine G du virus de la virémie printanière de la carpe (SVC) et des glycoprotéines ou des protéines associées aux membranes, téguments ou capsides du virus du poisson chat (CCV) ;

10 - lorsque les agents pathogènes sont des bactéries, par exemple : les protéines membranaires externes de régulation du fer (IROMP pour iron-regulated outer membrane protein) ; les protéines A de *Aeromonas salmonicida* qui provoque des furoncles ; la protéine p57 de *Renibacterium salmoninarum* qui provoque la maladie bactérienne du rein (BKD), les antigènes Eta6 et FliC de *Edwardsiella tarda* ;

- lorsque les agents pathogènes sont des parasites, par exemple : les antigènes de surface d'*Ichthyophthirius*.

20 La préparation du lipoplexe de vaccination génique selon l'invention est réalisée par mélange d'une solution de liposomes selon l'invention avec les vecteurs d'expression. L'étape de complexation se fait par ajout d'une solution à un pH neutre ou proche de la neutralité ($6,5 < \text{pH} < 8$) contenant le vecteur d'expression d'intérêt, à la suspension de liposomes vides préalablement dilués dans une solution aqueuse isotonique

25 à pH acide (pH~5). Le ratio utilisé de la variante préférée DOPE/DOTAP/cardioline (1:1:0,5, m/m/m) est de 25 µl de liposomes à 6,25 mg/ml pour 20 µg de vecteur d'expression d'ADN, soit un ratio massique ADN/lipides de 20/156,25, soit 0,128 mais ce ratio massique ADN/lipide peut plus largement être compris entre 0,01 et 0,5.

30 Les lipoplexes selon l'invention peuvent être administrés par la voie orale, par immersion d'une solution comprenant lesdits lipoplexes pour les animaux aquatiques, ou par les voies aériennes (spray nasal ou pulmonaire), ou encore par injection intramusculaire, intraveineuse ou intradermique. Dans le cas des poisons, l'administration

par immersion ou par mélange avec les granulés alimentaires permet de délivrer les lipoplexes sans aucun stress pour les animaux.

L'homme du métier adaptera la quantité de lipoplexes à administrer selon l'animal visé et l'agent pathogène.

5 Comme indiqué plus tôt, selon une forme particulière de l'invention, les lipoplexes sont encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène tel qu'un gel d'alginate, afin de former une formulation galénique en vue de leur administration par voie orale à des animaux d'élevage.

10 Les alginates sont des polysaccharides biodégradables et non-immunogènes obtenus à partir d'une famille d'algues brunes, les laminaires ; il s'agit plus particulièrement d'un polymère formé de deux monomères liés ensemble : le mannuronate ou acide mannuronique et le guluronate ou acide guluronique. D'autres gels biodégradables et non immunogènes peuvent être utilisés, il s'agit par exemple d'autres polysaccharides aux propriétés gélifiantes tels que, notamment les carraghénanes
15 (galactanes).

Pour préparer les formulations galéniques selon l'invention, une solution aqueuse au pH neutre et dépourvue de cations divalents contenant de l'alginate de sodium (alginate de grade pharmaceutique à faible viscosité) à une concentration comprise entre 2 et 10% est préparée ; elle est ensuite mélangée aux lipoplexes selon l'invention. L'ajout se
20 fait en suspension, volume à volume pour une solution d'alginate à 3%.

Le mélange est placé dans une seringue avec une aiguille d'un diamètre compris entre 0,10 et 0,40 mm et est extrudé goutte-à-goutte dans une solution de cations divalents (Ca^{++} , Ba^{++} , Mg^{++} etc) ou trivalent (Al^{3+}) afin de permettre la gélification de la formulation.

25 Les formulations galéniques sont donc composées de sphères gélifiées incorporant les liposomes vaccinaux ; ces sphères ont un diamètre compris entre 1 à 3 mm selon le diamètre de l'aiguille utilisée.

L'encapsulation à base de gel biodégradable et non immunogène présente l'avantage de protéger les liposomes vaccinaux, d'obtenir une formulation globulaire plus
30 attractive pour les poissons, d'améliorer l'adhésion des formulations aux muqueuses et d'augmenter la demi-vie de la formulation.

Comme l'illustre l'exemple 2, cette formulation galénique s'avère particulièrement adaptée pour la vaccination par voie orale de poissons d'élevage.

Ainsi les lipoplexes et les formulations galéniques selon l'invention présentent un intérêt pour leur utilisation en tant que médicament, en particulier, en tant que vaccin.

La présente invention se rapporte également à un lipoplexe ou à une
5 formulation galénique selon l'invention pour leur utilisation pour la vaccination d'animaux d'élevage contre des agents pathogènes choisis parmi les virus comme les rhabdovirus tels que le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV), le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (IPNV), le virus de la virémie printanière de la carpe (SVC), les herpesvirus tels que le
10 virus du poisson chat (CCV) ; les parasites tels que les *Ichthyophthirius* ; les bactéries comme *Aeromonas salmonicida* qui provoque des furoncles, *Renibacterium salmoninarum*, *Edwardsiella tarda* ; les levures et les champignons. De façon préférée, la présente invention se rapporte à une formulation galénique selon l'invention pour la vaccination orale de poissons d'élevage ; de préférence, ladite utilisation est
15 particulièrement adaptée à la vaccination orale de poissons d'élevage contre les rhabdovirus, en particulier, contre le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV).

La présente invention se rapporte encore à une méthode de vaccination d'animaux d'élevage comprenant une étape d'administration des lipoplexes ou des formulations galéniques selon l'invention.

20 **Figures**

Les **Figures 1** et **2** sont des représentations schématiques des plasmides respectivement pMCV1.4 et pcDNA3.1.

La **Figure 3** représente schématiquement le procédé mis en œuvre pour préparer les liposomes FELIA selon l'exemple 1.

25 La **Figure 4** est un histogramme représentant l'expression, dans divers organes, de plusieurs protéines clés de la réponse immunitaire (Mx, IFN2, IFN γ , NKEF, CMH I, CMH Ia, CMH II, CMH IIa, IL1 β , IgM et CD8) ; les barres représentent les ratios d'expression génique entre le groupe vacciné et (pG-FELIA) et le groupe contrôle (cFELIA).

30 La **Figure 5** représente la détection par PCR de l'expression du gène G du VHSV au niveau du tube digestif des truites après immunisation orale par les formulations galéniques selon l'invention, dénommées pG-FELIA (F). M représente le marqueur de poids moléculaire et N, le contrôle négatif.

La **Figure 6** est la mesure, par ELISA, des anticorps anti-G-VHSV dans le sérum des truites 1 (1m) et 2 mois (2m) après délivrance orale de FELIA de contrôle (groupe cFELIA, lipoplexes contenant des plasmides d'expression vides puis encapsulé dans un gel) et de FELIA contenant le gène G du VHSV (pG-FELIA). Les barres

5 représentent les densités optiques mesurées pour chaque truite du groupe contrôle (cFELIA) et du groupe vaccinés (pG-FELIA). Le contrôle positif C+ représente les résultats obtenus avec le sérum d'un poisson ayant survécu à une infection par le VHSV.

Les **Figures 7.1 à 7.10** représentent la mesure par PCR en temps réel de l'expression de gènes de la réponse immunitaire (respectivement Mx, CMH I, CD4,

10 NKEF, IFN γ , CMH II, CD8, IFN, IgM et IgT) dans le système digestif (Gut) et dans la rate (Spleen) des truites à différents temps (7, 15, 30, 60 et 120 jours) après immunisation. Les barres représentent les ratios d'expression génique entre le groupe vacciné et (pG-FELIA) et le groupe contrôle (cFELIA). Les données sont calculées pour des pools de 4 animaux.

L'invention est maintenant décrite plus en détail au regard des exemples

15 qui suivent. Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 – Procédé de préparation des liposomes selon l'invention

1. Préparation des liposomes

20 Chacun des deux lipides DOTAP et DOPE est préalablement solubilisé dans l'éthanol à raison de 20 mg de lipides/ml; ils sont ensuite mélangés dans un ratio 1:1.

Après une étape d'évaporation du solvant, le film lipidique obtenu est redissout par ajout d'une solution de cardiolipine dans de l'éthanol (à raison de 20 mg de lipides/ml) afin d'obtenir un ratio massique lipidique final DOPE:DOTAP:cardiolipine de

25 1:1:0,5.

2. Préparation des lipoplexes (liposome et matériel génétique)

Les lipoplexes sont ensuite préparés par simple injection de la solution plasmidique contenant le gène G du VHSV (pMCV1.4-G), ou de plasmide vide (pMCV1.4 ne contenant pas le gène G) comme contrôle, sur les liposomes préalablement dilués dans

30 une solution de NaCl (150 mM, pH 5,4). Le ratio utilisé pour les liposomes DOPE/DOTAP/cardiolipine (1 :1 :0,5, m/m/m) est de 25 μ l de liposomes à 6,25 mg/ml pour 20 μ g de vecteur d'expression ADN, soit un ratio massique ADN/lipides de 20/156,25, soit 0,128.

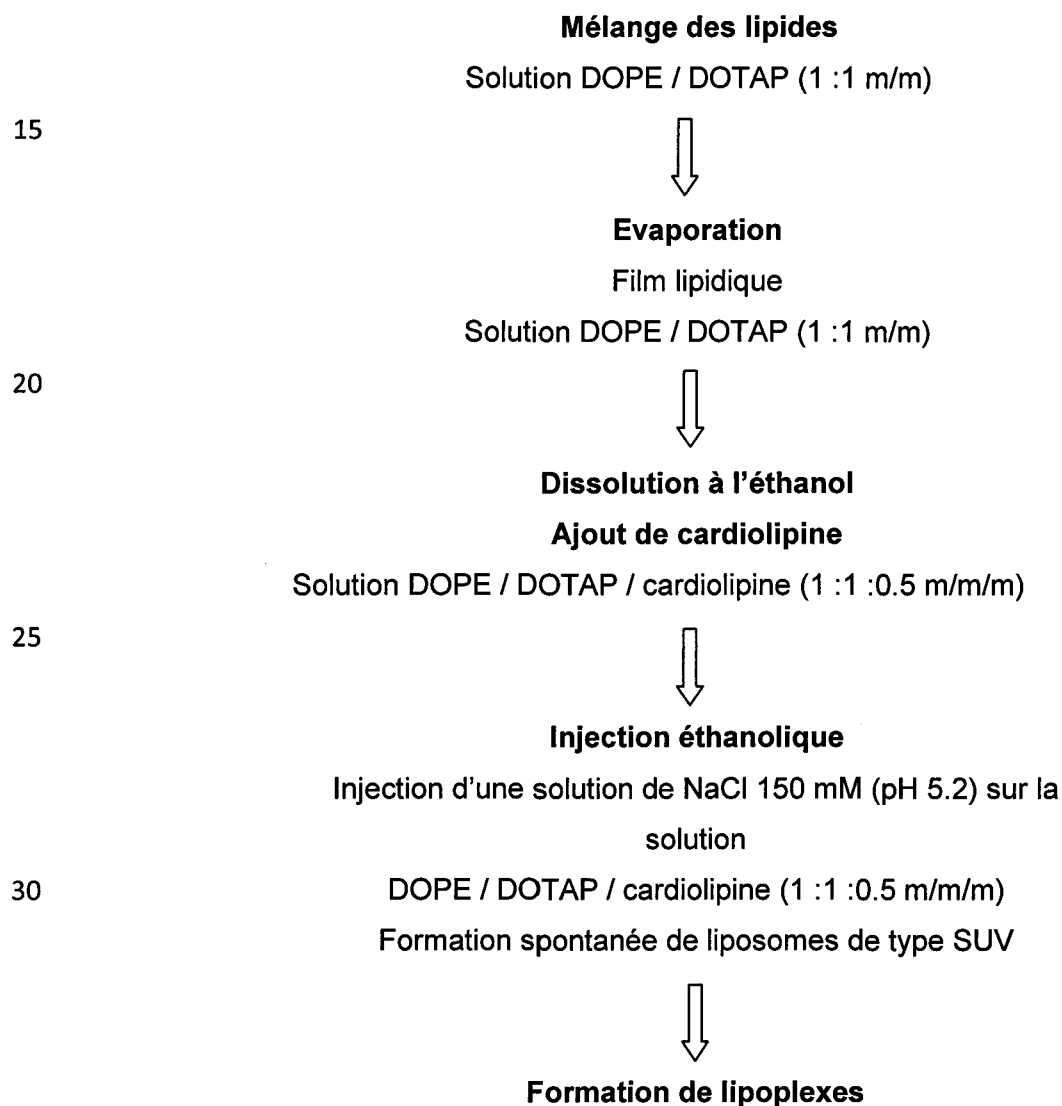
3. Préparation de la formulation vaccinale (lipoplexe encapsulé dans un gel d'alginate)

Les lipoplexes sont alors mélangés à de l'alginate de sodium (sodium d'acide alginique, 3%). La solution obtenue subit une étape de sphérification ; pour cela, le mélange est placé dans une seringue montée d'une aiguille de faible diamètre (27G, c'est-à-dire, présentant un diamètre externe d'environ 0,40 mm et une lumière de d'environ 0,20 mm) et extrudé goutte-à-goutte dans une solution de cations divalents (CaCl_2 , 100 mM).

Cette étape permet la gélification des gouttes en billes d'alginate contenant les liposomes ayant un diamètre compris entre 1 et 2 mm et dénommées FELIA (Fish Egg-like Liposomes In Alginate).

La mise en œuvre de ce procédé est schématisée ci-dessous et à la Figure

3.



Injection de la solution d'acides nucléiques (ADN) sur les liposomes DOPE / DOTAP / cardiolipine (1 :1 :0.5 m/m/m)



5

Mélange lipoplexes / alginate

Mélange lipoplexes / alginate 3% volume/volume



Formation des FELIA

10

Extrusion goutte à goutte et gélification en CaCl_2

Exemple 2 – étude *in vivo* de l'évaluation de l'efficacité : induction d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire par administration d'une formulation vaccinale selon l'invention par voie orale chez les truites

A) Description du matériel et des méthodes

15

L'expérience a été conduite avec des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) de 12 à 15 cm (22-40g). Chaque groupe était composé de 11 truites. Ces animaux ont été nourris en une fois avec un aliment du commerce mélangé soit avec des FELIA vides comme contrôle (cFELIA, sans le plasmide d'expression génique), soit avec des FELIA (pG-FELIA) contenant le plasmide d'expression du gène G du VHSV. Compte tenu de la quantité de nourriture ingérée par chaque poisson et de la concentration en plasmide de chaque particule de FELIA, la quantité de plasmides ingérée est estimée à 10 μg de plasmides. Après 1 à 2 mois d'alimentation normale, les truites ont été soumises à différentes analyses comme décrit ci-après.

20

1. Plusieurs types de tissus ont été prélevés pour étudier la réponse immunitaire des truites contre le VHSV.

25

Les prélèvements concernaient le tube digestif, les reins, la rate et le sang.

30

L'ARN total a été extrait en utilisant le Trizol (Invitrogen) selon les conditions du fournisseur. Les échantillons d'ARN ont été traités par de la DNase I pour éliminer toutes traces d'ADN génomique qui pourraient interférer avec la réaction de PCR (Polymerase chain reaction). Pour chaque échantillon, 1 microgramme (μg) d'ARN a été transformé en ADN complémentaire (ADNc) grâce au réactif Superscript III reverse transcriptase de Invitrogen. Dans ce but, les échantillons de 1 μg d'ARN ont été mélangés avec 1 μl d'oligo (dT) 12-18 (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et 1 μl de dinucléotides triphosphate (dNTP) à

10 millimolaire (mM) et incubés à 65°C. Après 5 minutes, 4 µl du tampon « 5x first strand buffer », 1 µl de dithiotréitol (DTT) à 0,1 molaire (M) et 1 µl du réactif « Superscript III reverse transcriptase » ont été ajoutés, mélangés et, le tout incubé pendant 1 heure à 50°C. La réaction a été stoppée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc ainsi obtenu a
 5 été dilué au dixième (1/10) dans de l'eau et conservé à moins 20°C.

Les niveaux d'expression de différents gènes clés de la réponse immunitaire ont ensuite été étudiés par PCR en temps réel comme décrit précédemment (*Cuesta and Tafalla, 2008*). Les mesures ont été effectuées sur des pools de 4 animaux. Les résultats sont exprimés par le ratio entre les données obtenus pour les animaux contrôle
 10 (cFELIA) et ceux ayant reçus les pG-FELIA.

2. Le sérum a également été récolté pour l'analyse de la réponse anticorps anti-G par la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Dans ce but, le sang a été prélevé au niveau de la veine caudale de 7 truites pour chaque groupe. Après coagulation à température ambiante pendant 1 heure
 15 puis incubation 1 nuit à 4°C, le sérum a été récolté. Le protocole ELISA a été adapté de celui décrit par Johansson *et al.* (*Johansson T, Einer-Jensen K, Batts W, Ahrens P, Björklund C, Kurath G, Björklund H, Lorenzen N. Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. Dis Aquat Organ. 2009, 86(3):213-21*).

20 3. L'expression de la protéine G du VHSV a été analysée au niveau du tube digestif des truites par réaction de PCR comme décrit dans *Cuesta & Tafalla, 2008*.

B) Résultats obtenus

La **Figure 4** montre l'expression de plusieurs protéines clés dans la réponse immunitaire telles que les interférons gamma (IFN γ) et IFN α ; la protéine Mx
 25 (induite par les interférons de type I), les molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I, aussi dénommée MHC I, et CMH II, aussi dénommée MHC II), le facteur NKEF, l'interleukine 1 beta (IL-1 β), les anticorps de type IgM (IgM) et le marqueur de surface CD8.

Les résultats démontrent que l'immunisation par le gène G du VHSV
 30 induit une forte transcription, 1) au niveau du tube digestif, de la molécule Mx et des anticorps IgM ; 2) dans la rate, des molécules CMH-I, CMH-II et du marqueur CD8 et 3) au niveau des reins, de Mx, IFN- γ , NKEF and MHC-II. Ces résultats prouvent que la

vaccination des truites par les FELIA contenant le gène G du VHSV stimule une réponse immunitaire cellulaire et moléculaire.

La **Figure 5** montre la détection par PCR du gène codant pour la protéine G au niveau du tube digestif des truites après immunisation par les pG-FELIA (F). Les résultats mettent en évidence l'expression de ce gène G dans les cellules du système digestif des truites des 4 semaines après la vaccination. Cette expression est toujours détectée 8 semaines après immunisation par les pG-FELIA (F).

La **Figure 6** présente les données de la réponse anticorps anti-GVHSV mesurées par ELISA 1 (1m) et 2 mois (2m) après vaccination par les pG-FELIA. Ces données confirment l'expression du gène G observée dans la figure 4 et démontrent l'induction consécutive d'une réponse anticorps spécifique du gène G du VHSV, 2 mois après l'administration par voie orale des particules de pG-FELIA.

Une dernière expérience a été réalisée avec des poissons plus petits (5-7 cm, 4-10 g). Dans ce cas, les FELIA ont été mixés avec les granulés alimentaires pour pouvoir délivrer environ 5 µg de plasmide pMCV1.4-G par poisson. Le groupe contrôle a reçu une même dose de FELIA contenant le plasmide vide.

La réponse immunitaire a été analysée à différents temps par PCR en temps réel dans la rate (Spleen) et le système digestif (Gut). En plus des marqueurs immunitaires décrits précédemment, le marqueur lymphocytaire CD4 et la mesure des immunoglobulines totales (IgT) ont été ajoutés.

Les résultats des Figures 7.1 à 7.10 montrent que l'administration du plasmide portant le gène G du VHSV au sein des FELIA est capable d'induire, à la fois, une réponse immunitaire locale (au niveau du tube digestif) et systémique (mise en évidence au niveau de la rate). Comme précédemment, une réponse anticorps anti-G-VHSV est effectivement détectée dans le sérum des poissons (voir le Tableau I).

Temps (jours)	Positives
7	1/5
15	3/5
30	4/5
60	3/5
120	3/5

Tableau I : Etude cinétique de la réponse anticorps anti-G-VHSV

Cette réponse est maximale à 30 jours avec 4 poissons sur 5 présentant une séroconversion. Elle est toujours détectable chez certains poissons, 120 jours post-vaccination.

- 5 Cette expérience démontre que la vaccination des truites avec 5 µg de plasmide G-VHSV est suffisante pour stimuler une réponse immunitaire cellulaire et humorale, spécifique du VHSV.

REVENDICATIONS

1. Liposome composé :

5 - de DOPE et/ou d'un variant du DOPE porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques choisi parmi la biotine, les oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément, les immunoglobulines ou leur fraction cristallisable,

10 - de DOTAP et/ou d'un variant du DOTAP porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques choisi parmi la biotine, les oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément, les immunoglobulines ou leur fraction cristallisable et

15 - de cardiolipine et/ou d'un variant de la cardiolipine porteur d'au moins un ligand pour le ciblage de cellules dendritiques choisi parmi la biotine, les oligonucléotides de type CpG, la flagelline, les protéines du complément, les immunoglobulines ou leur fraction cristallisable.

2. Liposome selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend entre 10 et 50% de DOPE et/ou de son variant, entre 10 et 50% de DOTAP et/ou de son variant et entre 5 et 30% de cardiolipine et/ou de son variant en poids par rapport au poids total de liposomes.

20 3. Liposome selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdits lipides sont présents dans un ratio DOPE et/ou de son variant : DOTAP et/ou de son variant : cardiolipine et/ou de son variant de 1:1:0,5 en poids.

25 4. Utilisation d'un liposome selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 comme support de matériel génétique pour la transfection de cellules *in vitro* ou *in vivo*.

5. Utilisation selon la revendication 4 comme support de matériel génétique de vaccination et de thérapie génique.

30 6. Lipoplexe de vaccination génique comprenant un liposome selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 associé à du matériel biologique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène.

7. Lipoplexe selon la revendication 6, caractérisé en ce que le matériel biologique est un plasmide dans lequel un fragment d'acide nucléique codant pour ledit polypeptide antigénique est cloné.

8. Lipoplexe selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6 pour une utilisation comme vaccin.

9. Formulation galénique caractérisée en ce qu'elle comprend des lipoplexes selon la revendication 6 ou 7 encapsulés dans un gel biodégradable et non immunogène.

10. Formulation galénique selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit gel biodégradable et non immunogène est un gel d'alginate.

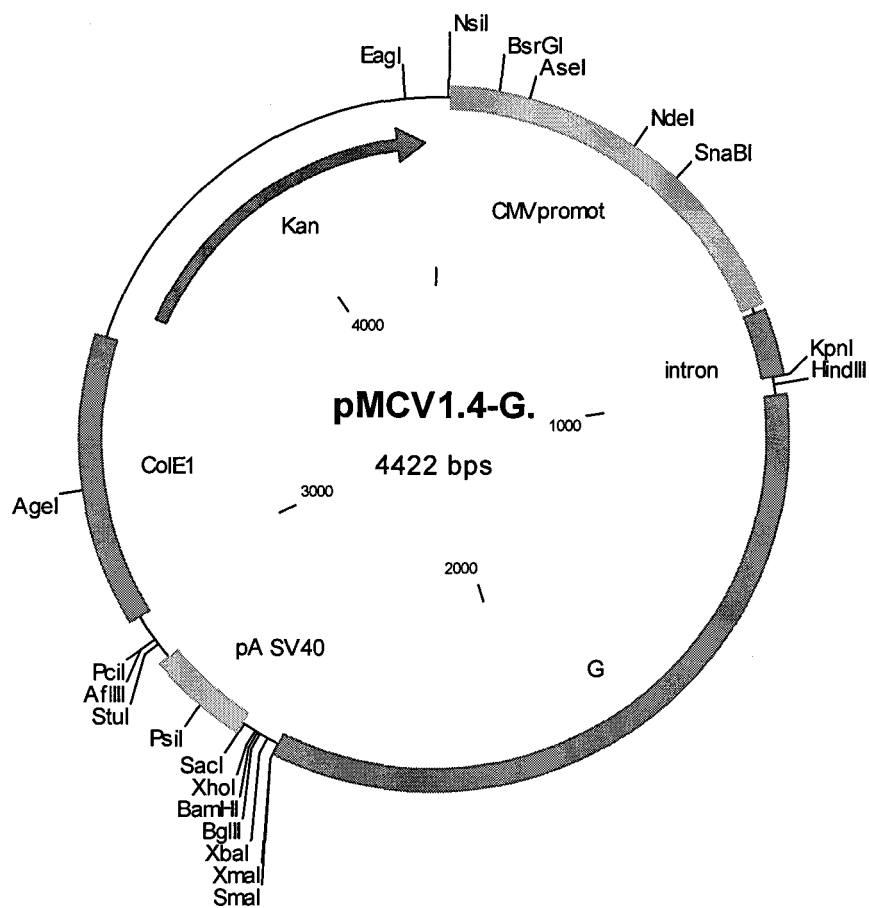
11. Formulation galénique selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit lipoplexe comprend, à titre de matériel génétique, un plasmide comprenant un fragment d'acide nucléique codant pour la protéine G du virus de la septicémie hémorragique.

12. Formulation galénique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 pour son utilisation en tant que médicament.

13. Formulation galénique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 pour son utilisation pour la vaccination d'animaux d'élevage.

14. Formulation galénique pour son utilisation selon la revendication 13 pour la vaccination de poissons d'élevage contre les rhabdovirus tels que le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV), le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (IPNV), le virus de la virémie printanière de la carpe (SVC), les herpesvirus tels que le virus du poisson chat (CCV); les parasites tels que les Ichthyophthirius; les bactéries comme *Aeromonas salmonicida* qui provoque des furoncles, *Renibacterium salmoninarum*, *Edwardsiella tarda*; les levures et les champignons.

15. Formulation galénique pour son utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit rhabdovirus est le virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV).

**Figure 1**

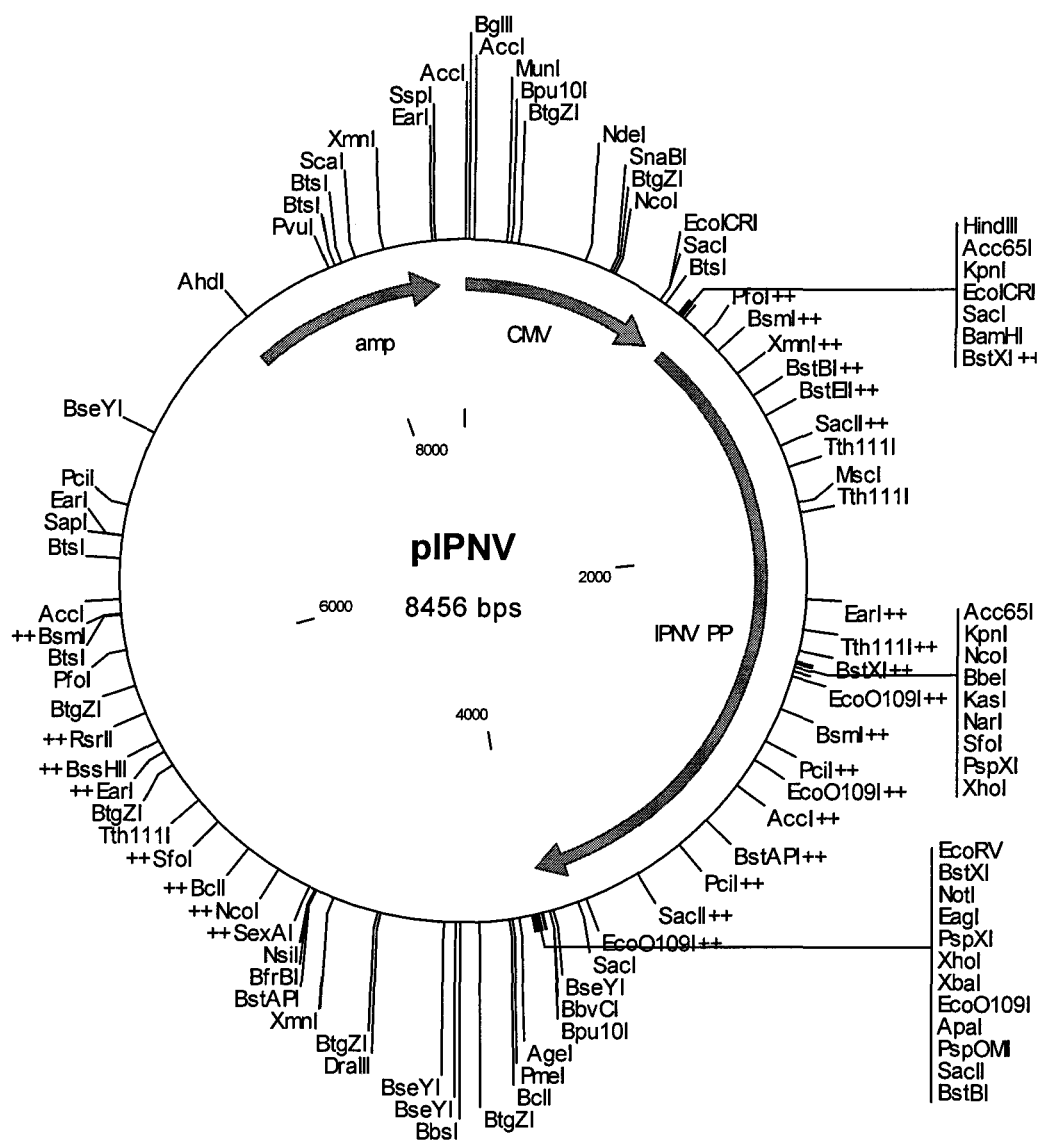


Figure 2

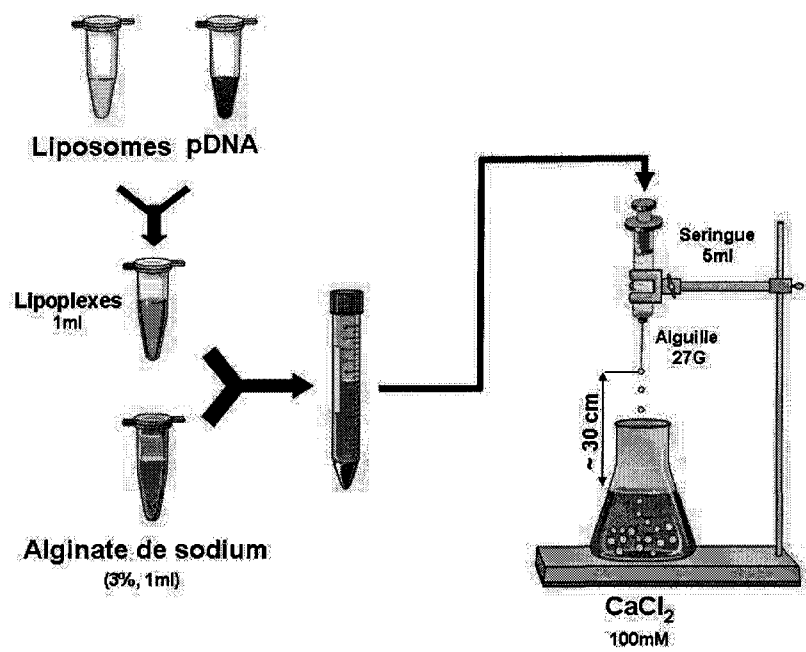


Figure 3

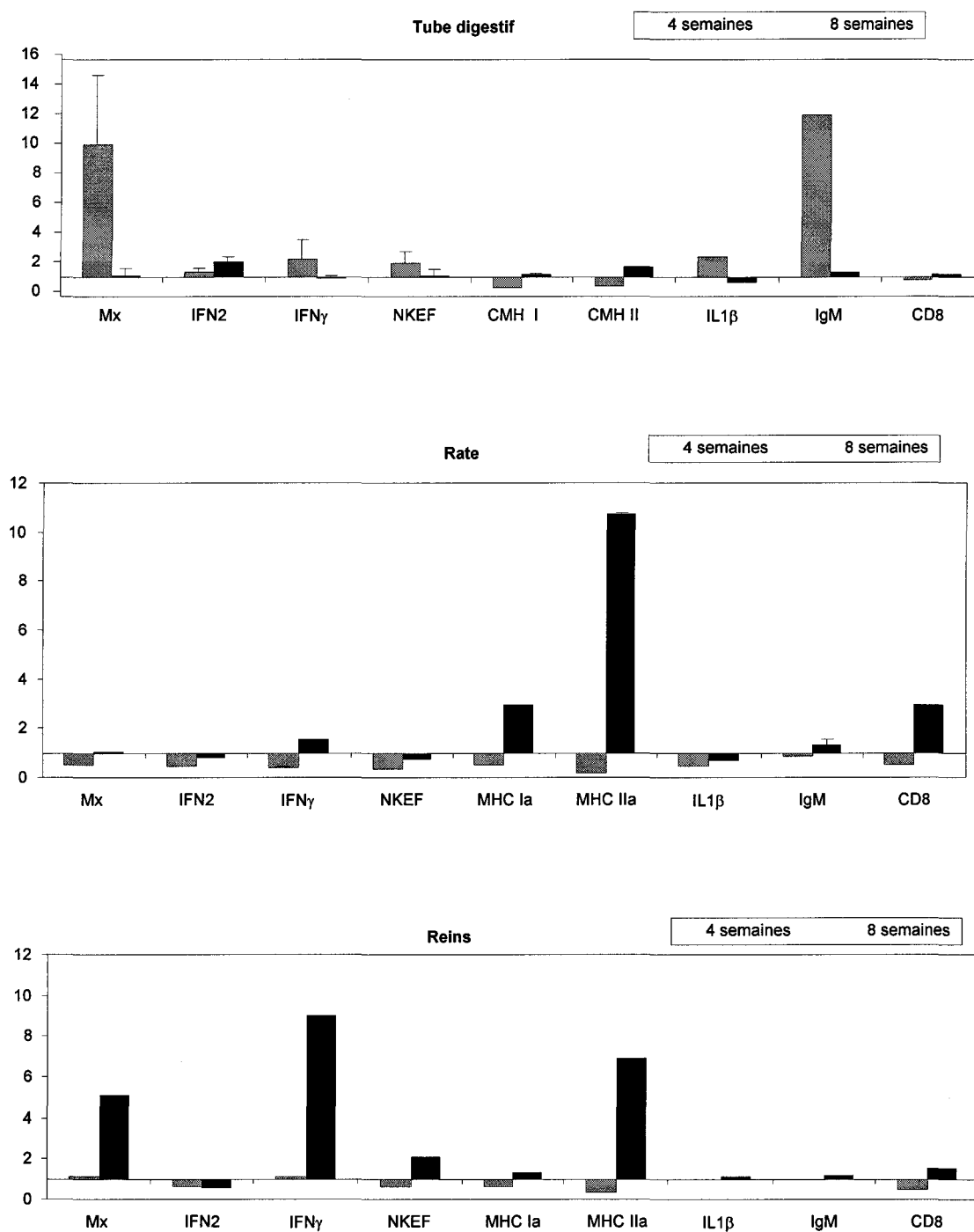
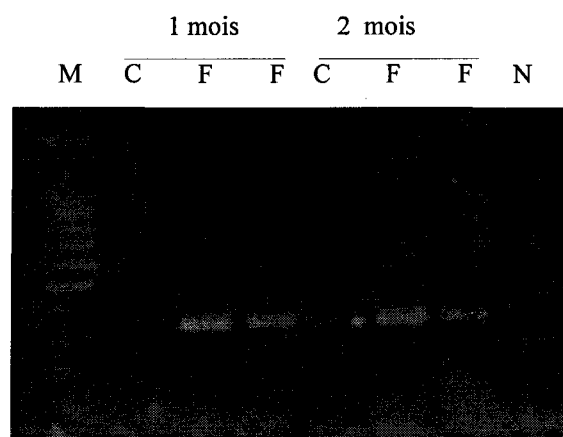
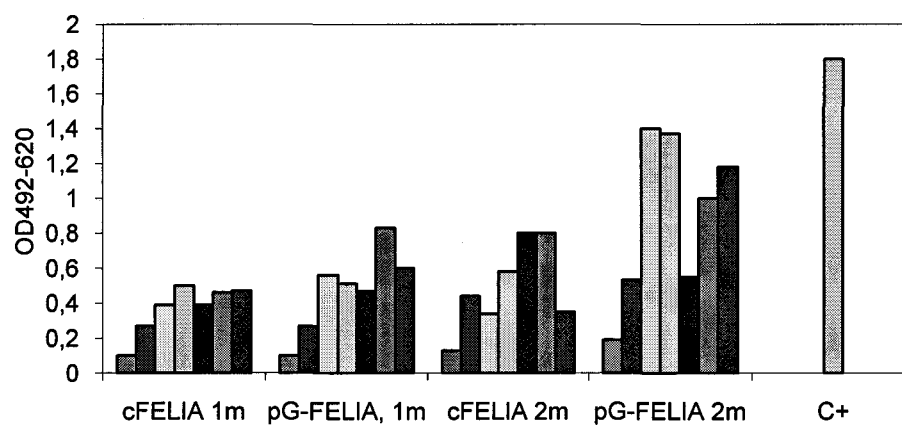
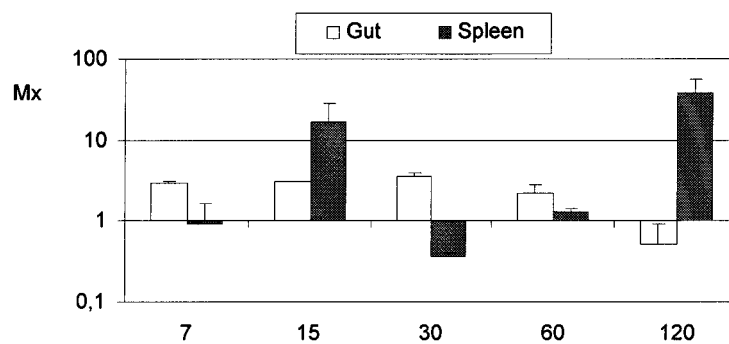
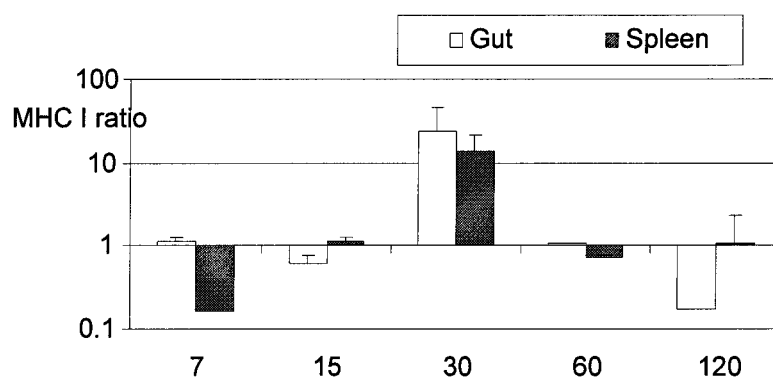
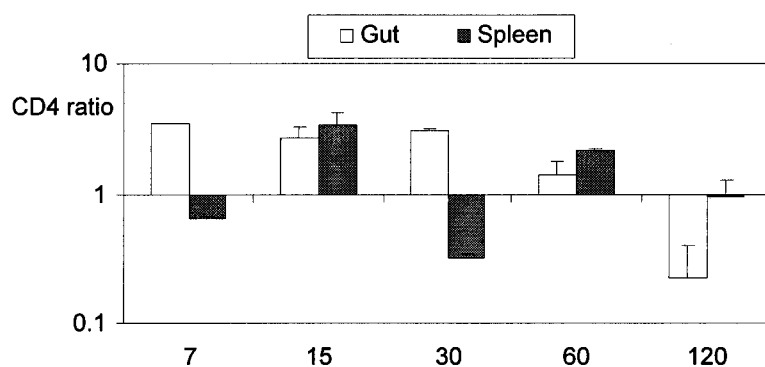
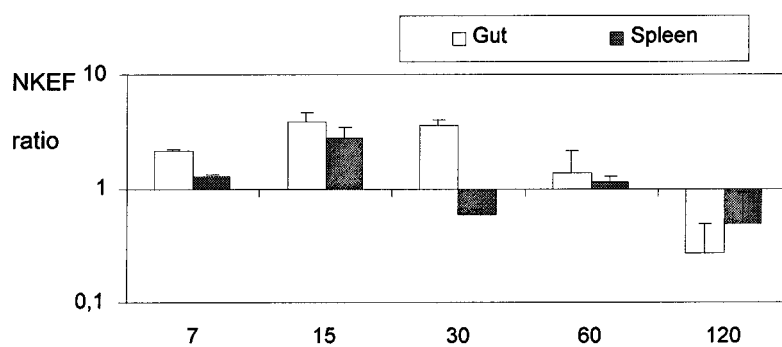
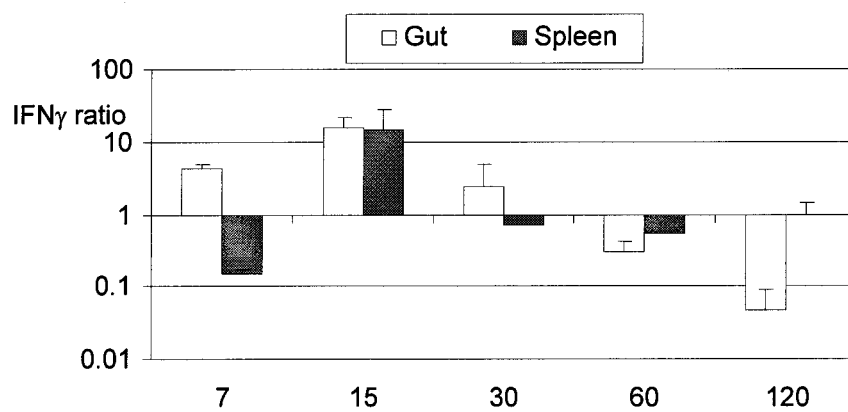
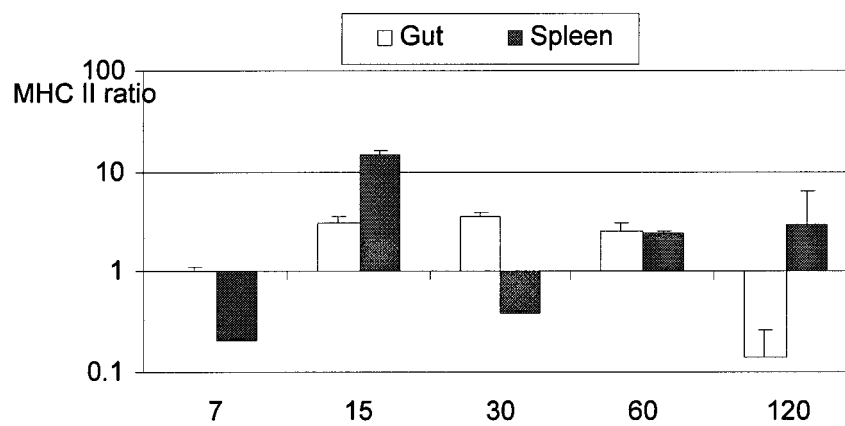
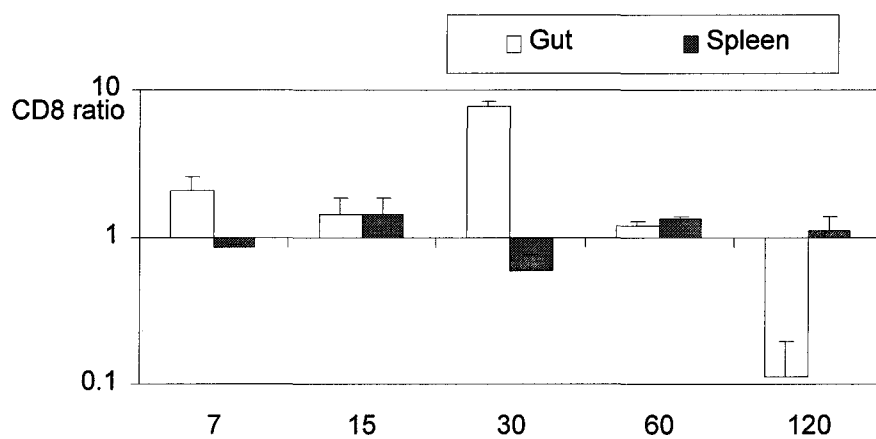
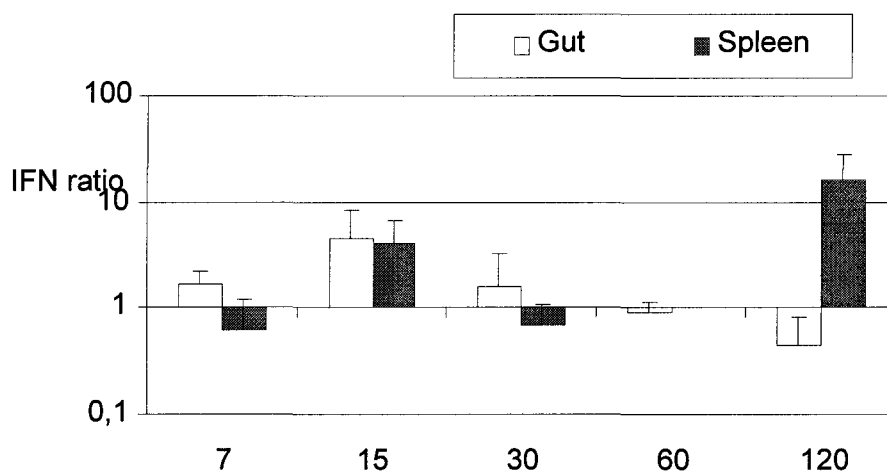
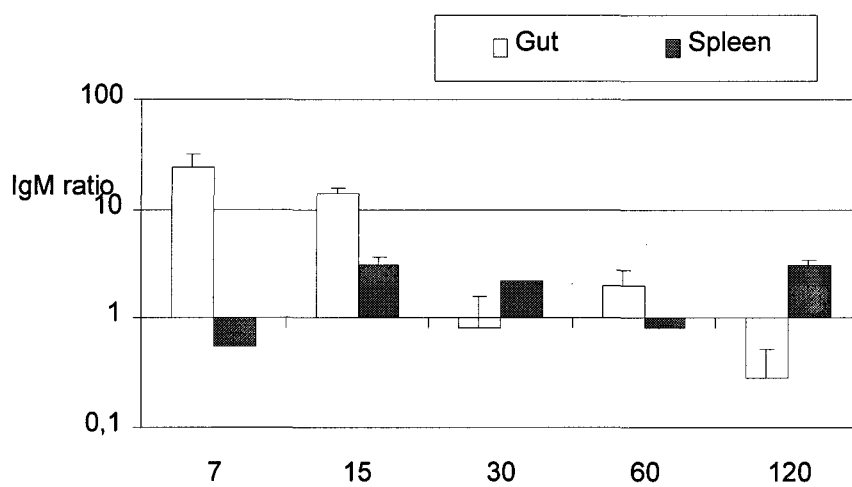


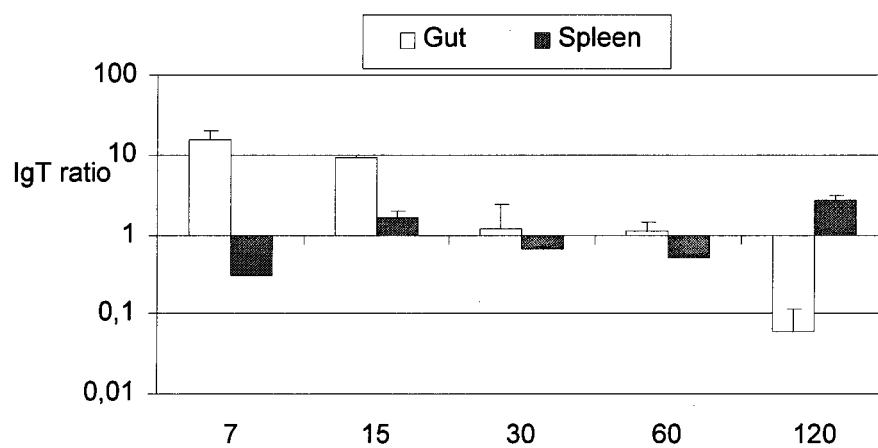
Figure 4

**Figure 5****Figure 6**

**Figure 7.1****Figure 7.2****Figure 7.3**

**Figure 7.4****Figure 7.5****Figure 7.6**

**Figure 7.7****Figure 7.8****Figure 7.9**

**Figure 7.10**

F1367 17FR listage séquences_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE POUR LE
DEVELOPPEMENT (CIRAD)
THE INTERNATIONAL INSTITUTE FOR AGRICULTURAL AND FOOD
RESEARCH AND TECHNOLOGY (INIA)

<120> Nouveaux liposomes de vaccination génique

<130> CB/es F1367 17FR

<160> 2

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 4422

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> plasmide d'expression pour vaccination génique

<400> 1

cgtctcgtcc cggctcctc ccatgcatgt caatattggc cattagccat attattcatt	60
ggttatatag cataaatcaa tattggctat tggccattgc atacgttgta tctatatcat	120
aatatgtaca tttatattgg ctcatgtcca atatgaccgc catgttggca ttgattattg	180
actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc	240
cgcgttacat aacttacggt aaatggcccgc cctggctgac cgcccaacga ccccgccca	300
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	360
caatgggtgg agtattttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	420
ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgcccag	480
tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt	540
accatggtga tgcggttttg gcagtacacc aatgggctg gatagcggtt tgactcacgg	600
ggattttcaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaatcaa	660
cgggactttc caaatgtcg taataacccc gcccgttga cgcaaatggg cggtaggcgt	720
gtacggtggg aggtctatat aagcagaggt cgtttagtga accgtcagat cactagtagc	780
tttattgcgg tagtttatca cagttaaatt gtaacgcag tcagtgtcg actgatcaca	840
ggtaagtatc aaggttacaa gacaggttta aggaggccaa tagaaactgg gcttgctgag	900
acagagaaga ttcttgcggt tctgataggc acctattggt cttactgaca tccactttgc	960
ctttctctcc acaggggtac cagtttaaac aagcttgaat tcgatggact agtatggaat	1020
ggaacacttt tttcttggtg atcttgatca tcatcataaa gagcaccaca ccacagatca	1080
ctcaacgacc tccggtcgaa aacatctcga cgtaccatgc agactgggac actccgctat	1140
acactcatcc ctccaactgc agggacgatt ctttgtccc gattcgacca gctcaactca	1200
ggtgtcctca tgaatttgaa gacataaaca agggactggt ttccgtccca accaggatca	1260
tccatctccc gctatcggtc accagcgtct ccgcagtagc gagtggccac tacctgcaca	1320

F1367 17FR listage séquences_ST25

gagtgactta	tcgagtcacc	tgttcgacca	gcttcttttg	agggcaaacc	atcgaaaaga	1380
ccatcttggg	ggcgaaactg	tctcgtcagg	aggccacaga	cgaggcaagc	aaggatcacg	1440
agtacccggt	cttccctgaa	ccctcctgca	tctggatgaa	aaacaatgtc	cataaggaca	1500
taactcacta	ttacaagacc	ccaaaaacag	tatcggtgga	tctctacagc	aggaaatttc	1560
tcaaccctga	tttcatagag	ggggtttgca	caacctcgcc	ctgtcaaact	cattggcagg	1620
gagtctattg	ggtcggtgcc	acacctaaag	cccattgccc	cacgtcggaa	acactagaag	1680
gacacctgtt	caccaggacc	catgatcaca	gggtggtcaa	ggcaattgtg	gcaggccatc	1740
atccctgggg	actcacaatg	gcatgcacag	tgacattctg	cgggacagaa	tggatcaaga	1800
ctgacctggg	ggacctgatc	caggtgacag	gaccgggggg	cacgaggaaa	ctgactccaa	1860
acaagtgtgt	caataccgat	atccagatga	ggggggcaac	agacgacttt	tcttatctca	1920
accatctcat	caccaacatg	gctcaaagaa	ccgagtgcct	agatgcccat	agtgatatca	1980
ccgcttcttg	gaaagtatcc	tcatttctcc	tctcaaagtt	tcgtcccagc	caccctggac	2040
ctggcaaggc	acactatctt	ctcgacggtc	aatcatgctg	aggtgactgt	gactatgagg	2100
cagtagtcag	catcaactac	aatcgcgctc	aatacaagac	gatgaacaac	acatggaaat	2160
catggaaacg	ggtagacaac	aacacagacg	ggtacgatgg	gatgatattt	ggggacaaat	2220
tgatcatccc	ggacatcgaa	aagtatcaga	gtgtctatga	cagtggaatg	ctcgttcaaa	2280
gaaaccttgt	ggaagtccct	catctgagca	ttgtgtttgt	ctccaacaca	tctgatcttt	2340
ccactaatca	catccacacc	aacctaatcc	cttcggattg	gtcattcaac	tggagtcttt	2400
ggccatcatt	atctgggatg	ggggttgtgg	gaggggcctt	ccttctactg	gtactctgct	2460
gttgctgcaa	ggcgtcccc	cccattccaa	attacgggat	tccgatgcag	cagttctcca	2520
gaagtcagac	ggtctgaccc	gggggaatca	ctagtgaatt	ctctagagat	atcctgcaga	2580
gatctggatc	cctcgaggct	agctccggag	tttaaacaga	gctcgatgag	tttggacaaa	2640
ccacaactag	aatgcagtga	aaaaaatgct	ttattttgtga	aattttgtgat	gctattgctt	2700
tatttgtaac	cattataagc	tgcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	2760
tgtttcaggt	tcagggggag	gtgtgggagg	ttttttaaag	caagtaaaac	ctctacaaat	2820
gtggtactta	agagggggag	accaaagggc	gagacgttaa	ggcctcacgt	gacatgtgag	2880
caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	ttttccata	2940
ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	3000
cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	3060
ttccgaccct	gccgcttacg	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	3120
tttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	3180
gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccc	accggtgcgc	cttatccggt	aactatcgtc	3240
ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	3300
ttagcagagc	gaggtatgta	ggcggtgcta	cagagttctt	gaagtgggtg	cctaactacg	3360

F1367 17FR listage séquences_ST25

```

gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcgga 3420
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccacgct ggtagcgggtg gtttttttgt 3480
ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 3540
tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgccgtc 3600
tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg gagcggcgat 3660
accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcgccgcca agctcttcag caatatcacg 3720
ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc agccggccac agtcgatgaa 3780
tccagaaaag cggccatttt ccacatgat attcggcaag caggcatcgc catgggtcac 3840
gacgagatcc tcgccgtcgg gcatgctcgc cttgagcctg gcgaacagtt cggctggcgc 3900
gagccccctga tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca agaccggctt ccatccgagt 3960
acgtgctcgc tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag ccggatcaag 4020
cgtatgcagc cgccgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag gagcaagggtg 4080
agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc agccagtccc ttcccgttc 4140
agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc acgatagccg 4200
cgctgcctcg tcttgagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga caaaaagaac 4260
cgggcgcccc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga ttgtctgttg 4320
tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg cgtgcaatcc 4380
atcttgttca atcataatat tattgaagca tttatcaggg tt 4422

```

<210> 2
 <211> 8456
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> plasmide d'expression pour vaccination génique

```

<400> 2
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660

```

F1367 17FR listage séquences_ST25

actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgt	acaactccgc	cccattgacg	caaattggcg	780
gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaacca	840
ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagt	900
taagcttggt	accgagctcg	gatccactag	tccagtgtgg	tgaattgcc	cttaagtcaa	960
tacaagatga	acacaaacaa	ggcaaccgca	acttacttga	aatccattat	gcttccagag	1020
actggaccag	caagcatccc	ggacgacata	acggagagac	acatcctaaa	acaagagacc	1080
tcgtcataca	acctagaggt	ctccgaatca	ggaagtggca	ttcttgtttg	tttcctggg	1140
gcaccaggct	cacggatcgg	tgcacactac	agatggaatg	cgaaccagac	ggggctggag	1200
ttcgaccagt	ggctggagac	gtcgcaggac	ctgaagaaag	ccttcaacta	cgggaggctg	1260
atctcaagga	aatacgacat	ccaaagctcc	acactaccgg	ccggtctcta	tgctctgaac	1320
gggacgctca	acgctgccac	cttcgaaggc	agtctgtctg	aggtggagag	cctgacctac	1380
aacagcctga	tgtccctaac	aacgaacccc	caggacaaaag	tcaacaacca	gctggtgacc	1440
aaaggagtca	cagtcctgaa	tctaccaaca	gggttcgaca	aaccatacgt	ccgcctagag	1500
gacgagacac	cccagggctc	ccagtcaatg	aacggggcca	agatgaggtg	cacagctgca	1560
attgcaccgc	ggaggtacga	gatcgacctc	ccatcccaac	gcctaccccc	cgcttctgctg	1620
acaggaaccc	tcaccactct	ctacgaggga	aacgccgaca	tcgtcaactc	cacaacagtg	1680
acgggagaca	taaacttcag	tctggcagaa	caaccgcga	acgagaccaa	gttcgacttc	1740
cagctggact	tcattgggct	tgacaacgac	gtcccagttg	tcacagtggg	cagctccgtg	1800
ctggccacaa	atgacaacta	cagaggagtc	tcagccaaga	tgaccagtc	catcccgacc	1860
gagaacatca	caaagccgat	caccagggtc	aagctgtcat	acaagatcaa	ccagcagaca	1920
gcaatcggca	acgtcgccac	cctgggcaca	atgggtccga	ctaccgtctc	cttctcatca	1980
gggaacggaa	atgtccccgg	cgtgctcaga	ccaatcacac	tgggtggccta	tgagaagatg	2040
acaccgctgt	ccatcctgac	cgtagctgga	gtgtccaact	acgagtcgta	cccaaacca	2100
gaactcctca	agaacatggg	gacacgctat	ggcaagtacg	accccgagg	tctcaactat	2160
gccaagatga	tcctgtccca	cagggaagag	ctggacatca	ggacagtgtg	gaggacagag	2220
gagtacaagg	agaggaccag	agtcttcaac	gaaatcacgg	acttctccag	tgacctgccc	2280
acgtcaaagg	catggggctg	gagagacata	gtcagaggaa	ttcggaaaagt	cgcagctcct	2340
gtactgtcca	cgctgtttcc	aatggcagca	ccactcatag	gaatggcaga	ccaattcatt	2400
ggagatctca	ccaagaccaa	cgcagcaggc	ggaagggtacc	actccatggc	cgcaggaggg	2460
cgccacaaag	acgtgctcga	gtcctgggca	agcggagggc	ccgacggaaa	attctcccga	2520
gccctcaaga	acaggctgga	gtccgccaac	tacgagggaag	tcgagcttcc	acccccctca	2580
aaaggagtca	tcgtccctgt	ggtgcacaca	gtcaagagtg	caccaggcga	ggcattcggg	2640
tccctggcaa	tcataattcc	aggggagtag	cccagcttc	tagatgcaa	ccagcaggtc	2700

F1367 17FR 11stage séquences_ST25

ctatcccact	tcgcaaacga	caccgggagc	gtgtggggca	taggagagga	catacccttc	2760
gagggagaca	acatgtgcta	cactgcactc	ccactcaagg	agatcaaaag	aaacgggaac	2820
atagtagtcg	agaagatctt	tgctggacca	atcatgggtc	cctctgctca	actaggactg	2880
tccctacttg	tgaacgacat	cgaggacgga	gttccaagga	tggtattcac	cggcgaaatc	2940
gccgatgacg	aggagacaat	cataccaatc	tgcggtgtag	acatcaaagc	catcgagacc	3000
catgaaccag	ggctgccact	catcggaac	caaccaggag	tggaagagga	ggtgcgaaac	3060
acatccctgg	ccgcacacct	gatccagacc	ggaaccctgc	ccgtacaacg	agcaaagggc	3120
tccaacaaga	ggatcaagta	cctgggagag	ctgatggcat	caaatgcatc	cgggatggac	3180
gaggaactgc	aacgcctcct	gaacgccaca	atggcacggg	caaagaagt	ccaggacgcc	3240
gagatctaca	aacttcttaa	gctcatggca	tggaaccagaa	agaacgacct	caccgaccac	3300
atgtacgagt	ggatcaaaaga	ggaccccgat	gcactaaagt	tcggaagct	catcagcacg	3360
ccaccaaaagc	accctgagaa	gcccgaagga	ccagaccaac	accacgcca	agaggcgaga	3420
gccacccgca	tatcactgga	cgccgtgaga	gccggggcgg	acttcgccac	accggaatgg	3480
gtcgcgctga	acaactaccg	cggcccatct	cccgggcagt	tcaagtacta	cctgatcact	3540
ggacgagaac	cagaaccagg	cgacgagtac	gaggactaca	taaaacaacc	cattgtgaaa	3600
ccgaccgaca	tgaacaaaat	cagacgtcta	gccaacagtg	tgtacggcct	cccacaccag	3660
gaaccagcac	cagaggagtt	ctacgatgca	gttgacagt	tattcgacac	gaacggaggc	3720
agagggtccc	accaggacca	aatgcaagac	ctcaggaggc	tcgcaagaca	gatgaaacga	3780
cgaccccgga	acgcccgatgc	accacggaga	accagagcgc	cagcggaacc	ggcaccgccc	3840
ggacgctcaa	ggttcacccc	cagcggagac	aacgctgagg	tgtaacaagg	gcaattctgc	3900
agatatccag	cacagtggcg	gccgctcgag	tctagagggc	ccgcggttcg	aaggtaagcc	3960
tatccctaac	cctctcctcg	gtctcgattc	tacgcgtacc	ggcatcatc	accatcacca	4020
ttgagtttaa	acccgctgat	cagcctcgac	tgtgccttct	agttgccagc	catctgttgt	4080
ttgcccctcc	cccgtgcctt	ccttgaccct	ggaaggtgcc	actcccactg	tcctttccta	4140
ataaaatgag	gaaattgcat	cgcattgtct	gagtaggtgt	cattctattc	tggggggtgg	4200
ggtggggcag	gacagcaagg	gggaggattg	ggaagacaat	agcaggcatg	ctggggatgc	4260
ggtgggctct	atggcttctg	aggcggaaag	aaccagctgg	ggctctaggg	ggtatcccca	4320
cgcgccctgt	agcggcgcat	taagcgcggc	gggtgtggtg	gttacgcgca	gcgtgaccgc	4380
tacacttgcc	agcgccttag	cgcccgtcc	tttcgctttc	ttcccttcct	ttctcgccac	4440
gttcgccggc	tttccccgtc	aagctctaaa	tcggggcatc	cctttagggt	tccgatttag	4500
tgctttacgg	cacctcgacc	ccaaaaaact	tgattagggt	gatggttcac	gtagtggggc	4560
atcgccctga	tagacggttt	ttcgcccttt	gacgttgag	tccacgttct	ttaatagtgg	4620
actcttggtc	caaactggaa	caacactcaa	ccctatctcg	gtctattctt	ttgatttata	4680
agggattttg	gggatttcgg	cctattgggt	aaaaaatgag	ctgatttaac	aaaaatttaa	4740

F1367 17FR listage séquences_ST25

cgcgaaattaa	ttctgtggaa	tgtgtgtcag	ttaggggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccca	4800
ggcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccaggt	gtggaaagtc	4860
cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	cagcaaccat	4920
agtccccgcc	ctaactccgc	ccatccccgc	cctaactccg	cccagttccg	cccattctcc	4980
gccccatggc	tgactaattt	tttttattta	tgcagaggcc	gaggccgcct	ctgcctctga	5040
gctattccag	aagtagtgag	gaggcttttt	tggaggccta	ggcttttgca	aaaagctccc	5100
gggagcttgt	atatccattt	tcggatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	cgtttcgcat	5160
gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	5220
ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtcg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	5280
gcaggggagc	ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	5340
ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	5400
cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	5460
tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	5520
gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	5580
cgagcgagca	cgtactcgga	tggaaagccg	tcttgtcgat	caggatgatc	tggacgaaga	5640
gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccagcgg	5700
cgaggatctc	gtcgtgacct	atggcgatgc	ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	5760
ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	5820
agcgttggct	accctgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	5880
cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	gcagcgcata	gccttctatc	gccttcttga	5940
cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggtc	gcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccacc	6000
tgccatcacg	agatttcgat	tccaccgccg	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	6060
ttttccggga	cgccggctgg	atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	6120
cccaccccaa	cttgtttatt	gcagcttata	atggttacaa	ataaagcaat	agcatcacia	6180
atttcacaaa	taaagcattt	ttttcactgc	attctagttg	tggtttgtcc	aaactcatca	6240
atgtatctta	tcatgtctgt	ataccgtcga	cctctagcta	gagcttggcg	taatcatggg	6300
catagctgtt	tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaa	tccacacaac	atacgagccg	6360
gaagcataaa	gtgtaaagcc	tgggggtgcct	aatgagtgag	ctaactcaca	ttaattgcgt	6420
tgcgctcact	gcccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	6480
gccaacgcgc	ggggagaggc	ggtttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	6540
actcgtgctg	ctcggctggt	cggctgcggc	gagcggatc	agctcactca	aaggcggtaa	6600
tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	6660
aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	6720
ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagagggtg	gcgaaacccg	acaggactat	6780

F1367 17FR listage séquences_ST25

aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt cgcaccctgc	6840
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcaatgct	6900
cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg	6960
aaccccccggt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc	7020
cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga	7080
ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa	7140
ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta	7200
gctcttgatc cggcaaaca accaccgctg gtagcggtagg tttttttggt tgcaagcagc	7260
agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg	7320
acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga	7380
tcttcaccta gatcctttta aattaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg	7440
agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct	7500
gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg	7560
agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc	7620
cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa	7680
ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc	7740
cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt	7800
cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc	7860
ccatgtttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgctc agaagtaagt	7920
tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc	7980
catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt	8040
gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata	8100
gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga	8160
tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag	8220
catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa	8280
aaaagggaat aaggcgaca cggaaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt	8340
attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga	8400
aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgctc	8456

CB/es - F136700017/FR/BN

DECLARATION

Demande de Brevet français

Aux noms de : - CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT (CIRAD)

- THE NATIONAL INSTITUTE FOR AGRICULTURAL AND FOOD
RESEARCH AND TECHNOLOGY (INIA)

Pour : « NOUVEAUX LIPOSOMES DE VACCINATION GENIQUE »

Invention : MOCKEY Michael, DEDIEU Laurence, TAFALLA Carolina, CUESTA Alberto

Je déclare que l'information fournie sous forme de support de données déchiffrable par machine est identique à celle que contient la liste des séquences écrite.



Claire BERNSTEIN
(N ° 09-0629)

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

ROMOREN ET AL: "Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells", *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*.

BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1717, no. 1, 10 novembre 2005 (2005-11-10), pages 50-57, XP005171446,

ISSN: 0005-2736, DOI: DOI:10.1016/J.BBAMEM.2005.09.011

THIERRY A R ET AL: "Lipoplex nanostructures reveal a general self-organization of nucleic acids", *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS*, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1790, no. 5, 1 mai 2009 (2009-05-01), pages 385-394, XP026093602, ISSN: 0304-4165, DOI: DOI:10.1016/J.BBAGEN.2009.03.017 [extrait le 2009-04-01]

US 7 491 409 B1 (MEERS PAUL R [US] ET AL)
17 février 2009 (2009-02-17)

ROMOREN K ET AL: "Immersion delivery of plasmid DNA - I. A study of the potentials of a liposomal delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry", *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 85, no. 1-3, 13 décembre 2002 (2002-12-13), pages 203-213, XP004397779,

ISSN: 0168-3659, DOI: DOI:10.1016/S0168-3659(02)00279-1

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES